

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-092077

(43)Date of publication of application : 07.04.1995

(51)Int.Cl.

G01N 15/14

G01N 21/64

(21)Application number : 05-261574

(71)Applicant : CANON INC

(22)Date of filing : 24.09.1993

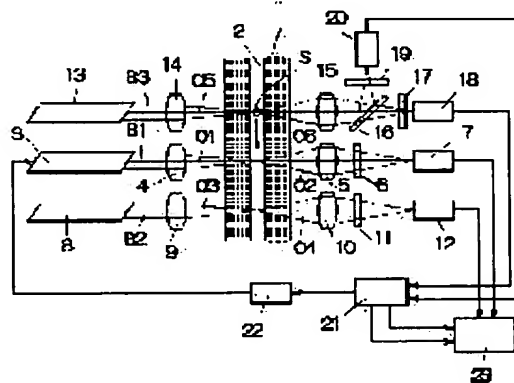
(72)Inventor : NUMAJIRI YASUYUKI

(54) GRAIN ANALYZING DEVICE

(57)Abstract:

PURPOSE: To emit a plurality of laser beams to a hemocyte cell-floating fluid, and precisely measure grain properties of multiple item without being influenced by discoloring.

CONSTITUTION: An optical beam is radiated to a grain S to be analyzed carried in a flow cell 11 from a third beam generating light source 13, and the generated fluorescence is detected by third and fourth optical detectors 18, 20 to identify the grain S to be analyzed. When the detection by a first optical detector 7 is required, on the basis of the identification result, the optical beam B1 from a first optical beam generating light source 3 is radiated in pulse form in a position downstream from the detecting position, and the generated fluorescence is detected by the first optical detector 7. The optical beam B2 from a second optical beam generating light source 8 is radiated in a position downstream from the first detecting position, and the generated fluorescence is detected by a second optical detector 12. These measurement results are analyzed by a control part 21 and a signal processing part 23, and the grain properties of multiple item of the grain S to be analyzed are measured.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-92077

(43) 公開日 平成7年(1995)4月7日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 15/14	D			
21/64	Z			

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-261574

(22) 出願日 平成5年(1993)9月24日

(71) 出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72) 発明者 沼尻 泰幸

神奈川県川崎市中原区今井上町53番地 キ

ヤノン株式会社小杉事業所内

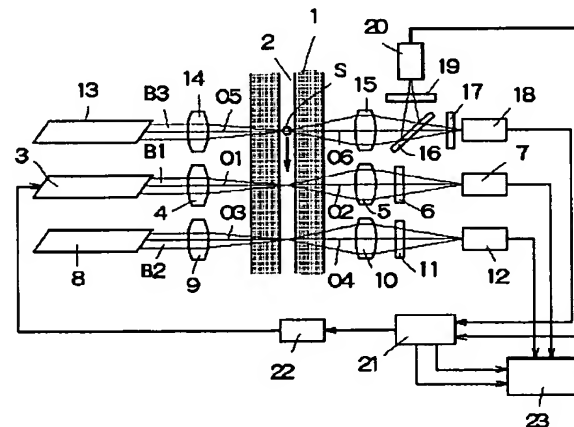
(74) 代理人 弁理士 日比谷 征彦

(54) 【発明の名称】 粒子解析装置

(57) 【要約】

【目的】 血球細胞浮遊液に複数のレーザー光を照射し、退色の影響を受けずに精度よく多項目の粒子的性質の測定を行う。

【構成】 フローセル1を流れる被検粒子Sに第3のビーム発生光源13から光ビームを照射し、発生する蛍光を第3及び第4の光検出器18、20により検出し、被検粒子Sの同定を行う。この同定結果に基づいて、第1の光検出器7による検出の必要がある場合は、この検出位置よりも下流の位置で、第1の光ビーム発生光源3からの光ビームB1をパルス状に照射し、発生する蛍光を第1の光検出器7により検出する。また、第1の検出位置よりも更に下流の位置で、第2の光ビーム発生光源8からの光ビームB2を照射し、発生する蛍光を第2の光検出器12により検出する。これらの測定結果を制御部21及び信号処理部23により解析し、被検粒子Sの多項目の粒子的性質の測定を行う。



(2)

特開平7-92077

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分離されて1個ずつ順次に流れる被検粒子の通過を検出し同定を行う同定手段と、被検粒子の通過を検出する位置よりも下流の位置で被検粒子に光ビームを照射する第1の光ビーム発生手段と、前記同定手段の結果に基づいて前記第1の光ビーム発生手段を制御する制御手段と、前記第1の光ビームの照射により被検粒子から発生する光を検出する第1の光検出手段と、前記第1の光ビームを照射する位置よりも更に下流の位置で被検粒子に第2の光ビームを照射する第2の光ビーム発生手段と、前記第2の光ビームの照射により被検粒子から発生する光を検出する第2の光検出手段と、前記同定手段の結果と前記第1及び第2の光検出手段から発生する信号に基づいて被検粒子の解析を行う信号処理手段とを有することを特徴とする粒子解析装置。

【請求項2】 前記同定手段は、被検粒子に光ビームを照射する第3の光ビーム発生手段と、第3の光ビームの照射により被検粒子から発生する光を検出する第3の光検出手段とを含み、該第3の光検出手段の結果に基づいて被検粒子の同定を行う請求項1に記載の粒子解析装置。

【請求項3】 前記制御手段は、前記同定手段の結果に基づいて被検粒子に前記第1の光検出手段による検出を必要とする場合には、被検粒子の通過を検出後に所定の遅延時間を経て、被検粒子が前記第1の光ビームの照射位置に達した時に、前記第1の光ビーム発生手段によりパルス状の前記第1の光ビームを発生させる請求項1に記載の粒子解析装置。

【請求項4】 前記制御手段は、前記同定手段の結果に基づいて被検粒子に前記第1の光検出手段による検出を必要としない場合には、被検粒子の通過を検出後に所定の遅延時間を経て被検粒子が前記第1の光ビームの照射位置に達する前に、前記第1の光ビーム発生手段による第1の光ビームの発生を中止し、被検粒子が前記第1の光ビーム照射位置を通過後に、再び前記第1の光ビーム発生手段により前記第1の光ビームを発生させる請求項1に記載の粒子解析装置。

【請求項5】 被検粒子を流す方式はシースフロー方式とした請求項1に記載の粒子解析装置。

【請求項6】 前記光ビーム発生手段はレーザー光源とした請求項1に記載の粒子解析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、例えばフローサイトメータのように、サンプル中の個々の被検粒子に光ビームを照射し、光学的測定法により被検粒子の解析を行う粒子解析装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 フローサイトメータは高速で流れる細胞浮遊液等のサンプル液に例えばレーザー光を照射し、そ

2

の散乱光や蛍光による光電信号を検出し、細胞の性質や構造を解明する装置であり、細胞化学、免疫学、血液学、腫瘍学、遺伝学等の分野で使用されている。

【0003】 フローサイトメータに用いられる従来の粒子解析装置では、フローセルの中央部の例えば $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ の微小な四角形断面を有する流通部内に、シース液に包まれて血球細胞等の被検粒子を通過させ、この被検粒子にレーザー光等の光ビームを照射し、被検粒子から発生する前方及び側方散乱光を検出することにより、被検粒子の形状、大きさ、屈折率等の粒子的性質を求めることができる。また、蛍光剤により染色可能な被検粒子に対しては、照射光とほぼ直角方向の側方散乱光から被検粒子の蛍光を検出することにより、被検粒子を解析するための重要な情報を求めることができる。

【0004】 更に、被検粒子から一度に多くの情報を得るために、複数のレーザー光源を用い、血球細胞上の複数の種類の抗原やDNAを、複数の蛍光をマーカーとして検出する粒子解析装置も使われている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら上述の従来の粒子解析装置では、蛍光剤の励起波長は通常は 100nm 程度の幅を有するため、3個以上の異なる波長のレーザー光を照射して解析を行う場合には、相互の励起波長差が十分大きくとれない。また、2種以上のレーザー光で励起をする際に既に蛍光剤の退色が生じており、本来得られるべき量の蛍光の検出ができず精度の良い解析が行えない。

【0006】 本発明の目的は、励起波長の異なる複数の蛍光剤を用い、波長が異なる複数のレーザー光を照射して、被検粒子について多項目の測定をする際に、退色の影響を受けずに精度の良い測定ができる粒子解析装置を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 上述の目的を達成するための本発明に係る粒子解析装置は、分離されて1個ずつ順次に流れる被検粒子の通過を検出し同定を行う同定手段と、被検粒子の通過を検出する位置よりも下流の位置で被検粒子に光ビームを照射する第1の光ビーム発生手段と、前記同定手段の結果に基づいて前記第1の光ビーム発生手段を制御する制御手段と、前記第1の光ビームの照射により被検粒子から発生する光を検出する第1の光検出手段と、前記第1の光ビームを照射する位置よりも更に下流の位置で被検粒子に第2の光ビームを照射する第2の光ビーム発生手段と、前記第2の光ビームの照射により被検粒子から発生する光を検出する第2の光検出手段と、前記同定手段の結果と前記第1及び第2の光検出手段から発生する信号に基づいて被検粒子の解析を行う信号処理手段とを有することを特徴とする。

【0008】

(3)

特開平7-92077

3

【作用】上述の構成を有する粒子解析装置は、分離されて1個ずつ順次に流れる被検粒子の通過を検出して同定を行い、この結果に基づいて、被検粒子の通過を検出する位置より下流の位置で第1の光ビームを照射し、発生する蛍光を第1の光検出手段により検出し、また前記第1の光検出位置よりも更に下流の位置で第2の光ビームによる第2の光検出手段により同様の検出を行い、これらの検出信号に基づいて信号処理手段において被検粒子の解析を行う。

【0009】

【実施例】本発明を図示の実施例に基づいて詳細に説明する。図1は本実施例の構成図であり、フローセル1の中心にはフロー部2が形成され、被検粒子Sは上から下にシースフロー方式によってシース液に包まれて流れている。

【0010】フローセル1の側方には、パルス状の第1の光ビームB1を発生する第1の光ビーム発生光源3が配置され、この第1の光ビーム発生光源3とフローセル1を結ぶ光路01には結像レンズ4が設けられ、フローセル1に対する光路01の後方側には、光路02上に集光レンズ5、バンドパスフィルタ6、第1の光検出器7が順次に配置され、第1の光検出系が構成されている。なお、図では便宜上、光路01の延長線上に光路02があるように描かれているが、実際には光路02は光路01とフローセル1に対してほぼ直角な方向に設定されている。

【0011】また、第1の光ビーム発生光源3の下方には、第2の光ビームB2を発生する第2の光ビーム発生光源8が配置され、この第2の光ビーム発生光源8とフローセル1を結ぶ光路03には結像レンズ9が設けられ、フローセル1に対する光路03の後方側には、光路02と平行な光路04が設けられ、その光路04上に集光レンズ10、バンドパスフィルタ11、第2の光検出器12が順次に配置され、第2の光検出系が構成されている。

【0012】更に、光ビーム発生光源3の上方には、第3の光ビームB3を発生する第3の光ビーム発生光源13が配置され、この第3の光ビーム発生光源13とフローセル1を結ぶ光路05上には結像レンズ14が設けられている。フローセル1に対する光路05の後方側には、光路02と平行な光路06上に集光レンズ15、ダイクロイックミラー16、バンドパスフィルタ17、第3の光検出器18が配置されている。また、ダイクロイックミラー16の反射方向にはバンドパスフィルタ19、第4の光検出器20が配置されている。この第3の光ビーム発生光源13から第3の光検出器18、第4の光検出器20までが、被検粒子Sの通過を検出するための第3の光検出系を構成している。

【0013】また、第3の光検出器18及び第4の光検出器20の出力は制御部21に接続され、この制御部21の出力はドライバ22を介して第1の光ビーム発生光源3に接続されている。更に、制御部21の出力と第1

4

の光検出器7、第2の光検出器12の出力は信号処理部23に接続されている。被検粒子Sの通過を検出する第3の光検出系とこの制御部21とにより、被検粒子Sの通過を検出し同定を行う同定手段を構成している。

【0014】例えば、被検粒子Sとしての試料には人間の末梢血単核細胞を用い、FITC(Fluorescein Isothiocyanate)標識のCD4抗体、PE(Phycoerythrin)標識のCD8抗体、テキサスレッド標識のLeu-8抗体、APC(Allophycocyanin)標識のCD11b抗体を反応させる。FITCとPEは波長488nmのアルゴンイオンレーザーに励起され、それぞれ520nmと578nmにピークを持つ蛍光を発生する。テキサスレッドは波長596nm付近のダイレーザに励起されて波長620nmピークの蛍光を発生し、APCは波長633nmのヘリウムネオンレーザーに励起されて波長660nmピークの蛍光を発生する。

【0015】また、CD4抗体はヘルパT細胞及びインデューサT細胞と反応し、CD8抗体はサブプレッサT細胞及び細胞傷害性T細胞と反応する。Leu-8抗体はT細胞、B細胞、単球、顆粒球と反応し、特にCD4抗体と反応するT細胞の内、インデューサT細胞とは反応するが、ヘルパT細胞とは反応しない。そして、CD11b抗体はT細胞、NK細胞、好中球、好酸球、単球と反応し、特にCD8抗体と反応するT細胞の内、サブプレッサT細胞とは反応するが、細胞傷害性T細胞とは反応しない。

【0016】第1の光ビーム発生光源3としては波長596nmのパルス時間10μSのダイレーザを用い、第2の光ビーム発生光源8としては波長633nmのヘリウムネオンレーザーを用い、第3の光ビーム発生光源13としては波長488nmのアルゴンイオンレーザーを用いている。

【0017】第3の光ビーム発生光源13から発生する第3の光ビームB3は、結像レンズ4でフローセル1の中心に集光される。このフローセル1のフロー部2を流れる被検粒子SがCD4抗原を持っている場合には、その標識としてのFITCが励起され、波長520nmの蛍光が発生する。一方、被検粒子SがCD8抗原を持っている場合には、その標識としてのPEが励起され波長578nmの蛍光が発生する。

【0018】これらの蛍光は集光レンズ5で集光され、波長520nmの光を反射して波長578nmの光を透過するダイクロイックミラー16を介し、波長578nmの蛍光はバンドパスフィルタ17を通過して第3の光検出器18に入射し、一方、波長520nmの蛍光はバンドパスフィルタ19を通過して第4の光検出器20に入射する。バンドパスフィルタ17、19はそれぞれ、波長578nm、波長520nm以外の外光を、第3の光検出器18、第4の光検出器20に入射させないためのものである。

(4)

特開平7-92077

5

【0019】第1の光ビーム発生光源3である波長596nmでパルス時間10μSのダイレーザから発生する第1の光ビームB1は、結像レンズ4でフローセル1の中心に集光される。被検粒子SがLeu-8抗原を持っている場合には、その標識としてのテキサスレッドが励起され、波長620nmの蛍光が発生する。この蛍光は集光レンズ5で集光され、バンドパスフィルタ6を通過して第1の光検出器7に入射する。バンドパスフィルタ6は波長620nm以外の外光を第1の光検出器7に入射させないためのものである。

【0020】同様に、第2の光ビーム発生光源8である波長633nmのヘリウムネオンレーザから発生する第2の光ビームB2は、結像レンズ9でフローセル1の中心に集光され、被検粒子SがCD11b抗原を持っている場合には、その標識としてのAPCが励起されて波長660nmの蛍光が発生し、この蛍光は集光レンズ10で集光され、バンドパスフィルタ11を通過して第2の光検出器12に入射する。バンドパスフィルタ11は波長660nm以外の外光を、第2の光検出器12に入射させないためのものである。

【0021】第3の光検出器18に入射したPEからの蛍光、又は第4の光検出器20に入射したFITCからの蛍光は、電気信号に変換され制御部21に送られる。制御部21は、被検粒子Sからの蛍光が大きなレベルの電気信号を出力した場合にのみ、その電気信号を信号処理部23に送る。

【0022】例えば、被検粒子SがCD4抗原を持っている場合、即ちFITCからの蛍光が第4の光検出器20に入射して大きなレベルの電気信号が発生する場合には、制御部21は被検粒子Sが第1の光ビームB1の照射位置に到達する所定の遅延時間後に、ドライバ22にトリガ信号を送るという制御を行い、信号処理部23では同じ所定の遅延時間後に第1の光検出器7からの電気信号を取り込む動作を行う。そして、ドライバ22がトリガ信号を受けると、第1の光ビーム発生光源3であるダイレーザから、パルス時間10μS、波長596nmの第1の光ビームB1が射出される。

【0023】また、制御部21は被検粒子SがCD8抗原を持っている場合、即ちPEからの蛍光が第3の光検出器18に入射して大きなレベルの電気信号が発生する場合にはその電気信号を信号処理部23に送り、信号処理部23では被検粒子Sが第2の光ビームB2の照射位置に到達する所定の遅延時間後に第2の光検出器12からの電気信号を取り込む動作を行う。

【0024】第1の光検出器7又は第2の光検出器12で検出された電気信号は、信号処理部23に送られA/D変換されて被検粒子Sの解析に用いられる。また、制御部21から信号処理部23に送られた電気信号も、A/D変換されて被検粒子Sの解析に用いられる。免疫検

6

査ではヘルパT細胞、サブレッサT細胞の数の比率が重要であるが、本実施例ではFITCからの蛍光がありテキサスレッドからの蛍光が無い被検粒子SはヘルパT細胞と判断され、PEからの蛍光がありAPCからの蛍光もある被検粒子SはサブレッサT細胞と判断される。

【0025】通常、APCは第1の光ビーム発生光源3である波長596nm付近のダイレーザでも或る程度の励起を受けるが、本実施例の方法によればこのダイレーザからの照射を受けることはないで退色は起こらず、第2の光ビーム発生光源8である波長633nmのヘリウムネオンレーザにより励起されて発生する蛍光を正確に検出することができる。なお、第3の光ビーム発生光源13である波長488nmのアルゴンイオンレーザによるテキサスレッド及びAPCの励起は極く僅かしか起こらないので、これによる退色は殆ど問題とならない。

【0026】本実施例では、第3の光ビーム発生光源13、第3及び第4の光検出器18及び20、制御部21等が被検粒子Sから発生する蛍光の波長を検出して被検粒子Sの同定を行う同定手段を構成しているが、被検粒子Sをその大きさにより同定する場合には、一般に知られている散乱光を検出する方法や、被検粒子Sが細孔を通過する時の電気抵抗を検出する方法等を用いることもできる。

【0027】また、本実施例では第1の光検出手段により検出を必要とする場合に、被検粒子が第1の光ビームの照射位置に達した時に第1のビームB1をパルス状に発生しているが、逆に第1の光検出手段により検出を必要としない場合に第1の光ビームB1の発生を中止するようにしてもよい。

【0028】

【発明の効果】以上説明したように本発明に係る粒子解析装置においては、被検粒子の同定の結果に基づいて、下流位置での光ビームの照射の有無を制御することにより、励起波長の異なる複数の蛍光剤を用い、3個以上の異なる波長のレーザ光を照射する場合でも、退色の影響を受けずに多項目の測定を精度良く行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例の構成図である。

【符号の説明】

- 1 フローセル
- 2 フロー部
- 3、8、13 光ビーム発生光源
- 7、12、18、20 光検出器
- 21 制御部
- 22 ドライバ
- 23 信号処理部

(5)

特開平7-92077

【図1】

